

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ ТА НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ
“КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ
імені ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО”**

Основи генетичної та клітинної інженерії

Частина I Генетичне конструювання *in vivo*

Методичні вказівки
до виконання лабораторних робіт для студентів
спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»

*Рекомендовано Вченою радою
факультету біотехнології і біотехніки КПІ імені Ігоря Сікорського*

Київ
КПІ імені Ігоря Сікорського
2017

Основи генетичної та клітинної інженерії. Ч. I. Генетичне конструювання *in vivo*: метод. вказівки до виконання лабораторних робіт для студентів спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» / Уклад. : І.Р. Клечак, Т.С. Тодосійчук, В.М. Ліновицька, Л.О. Тітова. – Київ : КПІ імені Ігоря Сікорського, 2017. – 50 с.

Рекомендовано Вченою радою ФБТ КПІ імені Ігоря Сікорського (Протокол № 2 від 25.09.2017 р.)

Навчальне видання

Основи генетичної та клітинної інженерії

Частина I

Генетичне конструювання *in vivo*

Методичні вказівки

до виконання лабораторних робіт для студентів
спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»

Укладачі: *Клечак Інна Ришардівна*, канд. техн. наук, доц.,
Тодосійчук Тетяна Сергіївна, д-р техн. наук, доц.,
Ліновицька Віта Михайлівна,
Тітова Лариса Олександрівна, канд. техн. наук

Відповідальний
редактор *О.Ю. Галкін*, д-р біол. наук, доц.

Рецензент *С.О. Соловийов*, канд. біол. наук, доц.

ЗМІСТ

Вступ	4
Застереження	5
<i>Лабораторна робота 1</i>	
Підготовка штаму до селекційної роботи	6
<i>Лабораторна робота 2</i>	
Отримання мутантних штамів за допомогою УФ-опромінення	12
<i>Лабораторна робота 3</i>	
Використання хімічних мутагенів для одержання надпродуцентів біологічно активних речовин	18
<i>Лабораторна робота 4</i>	
Виділення ауксотрофних мутантів	22
4.1. Метод збагачення ауксотрофними мутантами	24
4.2. Відбір ауксотрофів	25
<i>Лабораторна робота 5</i>	
Аналіз штамів, отриманих в результаті генетичного конструювання <i>in vivo</i>	29
5.1. Тест на синтрофізм	32
5.2. Визначення стійкості отриманих мутацій (реверсії) та повноти реверсії (повноти генетичного блоку)	34
Вимоги до оформлення протоколів	36
Список літератури	37
Додаток А	38
Додаток Б	39
Додаток В	40
Додаток Г	41
Додаток Д	42
Додаток Е	43
Додаток Є	44

ВСТУП

Дисципліна «Основи генетичної та клітинної інженерії» викладається згідно навчального плану підготовки бакалаврів спеціальності «Біотехнології та біоінженерія» і призначена ознайомити студентів з можливостями створення нових високопродуктивних штамів мікроорганізмів, рослин, тварин з застосуванням методологічних підходів традиційної селекції та методів, що виникли у зв'язку з появою принципово нових об'єктів біотехнології – рослинних та тваринних клітин. За своїм змістом дисципліна займає визначне місце в процесі підготовки фахівців з біотехнології і є продовженням дисципліни «Генетика».

Лабораторний практикум з дисципліни «Основи генетичної та клітинної інженерії» призначений для отримання навичок з експериментальної роботи в галузі генетичної та клітинної інженерії і складається з 3 частин: генетичне конструювання *in vivo*, біотехнологія рослинної клітини та застосування клітинних культур в біотехнології і вірусології. В процесі виконання лабораторних робіт в рамках 1 частини «Генетичне конструювання *in vivo*» студенти засвоюють методи і техніку постановки і проведення експериментів по отриманню біологічних агентів з використанням методів традиційної селекції та знайомляться з одним з модельних об'єктів генетичної інженерії – *Bacillus subtilis*.

Кожне лабораторне заняття складається з чотирьох етапів. На першому етапі відбувається обговорення ходу лабораторної роботи та особливостей виконання деяких операцій, а також перевірка правильності складеної студентами блок-схеми експерименту. На другому етапі виконується відповідна лабораторна робота. На третьому етапі кожна бригада проводить підготовку до стерилізації посуду і розчинів, необхідних для виконання наступної лабораторної роботи. По закінченню перших трьох етапів студенти захищають лабораторні роботи. Захист проводиться письмово і складається з питань по змісту лабораторних робіт і лекційному матеріалу.

В залежності від часу, відведеного у робочому навчальному плані на проведення лабораторних робіт, форми навчання та спеціалізації студентів можливе проведення наведених робіт в повному обсязі або частини на вибір.

ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

1. На лабораторних столах не повинно бути зайвих речей, обов'язковим є наявність блок-схеми експерименту та лише необхідного канцелярського приладдя.
2. На лабораторному практикумі студенти працюють у халатах і латексних або нітрилових рукавичках. По закінченню всіх видів робіт, у тому числі прибирання робочого місця, рукавички викидають у спеціальні ємності та обов'язково миють руки з використанням дезінфікуючих засобів.
3. Для проведення лабораторного практикуму використовуються тільки стерильні поживні середовища, буферні розчини, фізіологічний розчин, інструменти та матеріали.
4. Мікробіологічні петлі до та після роботи дезінфікують у полум'ї пальника, шпатель Дригальського занурюють у розчин етанолу і обпалюють у полум'ї пальника. Піпетки одразу після використання занурюють у ємність із дезрозчином. По закінченню роботи ватні фільтри з піпеток виймають.
5. При роботі з градуйованою піпеткою, до якої під'єднана гумова трубка з грушею, необхідно слідкувати, щоб при наборі рідин не відбувалось потрапляння суспензії у ватний фільтр піпетки та грушу.
6. У разі потрапляння біологічного матеріалу на робочий стіл проводиться обробка забрудненої поверхні дезінфікуючим розчином. Розчини та використаний лабораторний посуд, які не потрібно зберігати, віддають на знезараження. Розчини, що забруднені біологічним матеріалом, зливати в каналізацію категорично забороняється.

7. У випадку використання газового пальника необхідно впевнитись у його стійкому та зручному розташуванні на робочому столі та зважати, що при роботі з ним можливий «проскок» полум'я, що може призвести до загоряння гумової трубки або предметів, які знаходяться поруч. При роботі зі спиртівками забороняється запалювати спиртівки одну від одної.

Лабораторна робота 1

Підготовка штаму до селекційної роботи

Короткі теоретичні відомості

Метод отримання промислових штамів за допомогою індукованого мутагенезу можна розділити на декілька етапів:

- вибір вихідного організму для селекції;
- підготовка вихідного штаму до селекційної роботи (чистка та стабілізація культури);
- отримання мутантів;
- відбір мутантів.

Вибір вихідного мікроорганізму для селекції

Різноманітність природних форм дозволяє вибрати мікроорганізм, який має меншу кількість обмежень для надсинтезу певної речовини, хоча при цьому може і не продукувати його.

Що є критерієм придатності мікроорганізму для використання як об'єкта селекції на отримання надпродуцента? Для отримання відповіді у потенційний об'єкт вводять одну або декілька певних мутацій, що легко тестуються, теоретично повинні викликати надсинтез даної речовини і можуть бути апробовані на іншому мікроорганізмі. Якщо одну і ту ж речовину виділяють природні штами, що належать до різних таксономічних груп (гриби та бактерії), то вибирають технологічніший або такий, що краще піддається селекції штам.

Таким чином, селекціонер є вільним у виборі вихідного штаму для селекції і не можна вважати критерієм такого вибору генетичну вивченість мікробного об'єкту.

Після вибору вихідного об'єкту для селекції необхідно перейти до наступного етапу – підготовки вихідного штаму до селекційної роботи.

Перш за все у організму, який взято як об'єкт селекції, необхідно вивчити *природну мінливість за морфологічними ознаками і за кількісною ознакою* – рівнем продукування досліджуваної речовини.

Етапи підготовки штаму до селекційної роботи:

- дослідження природної мінливості за морфологічними та кількісними ознаками;
- розсів вихідного штаму на чашки Петрі (не менше 100 колоній) та оцінювання їх за морфологічними ознаками;
- оцінювання отриманих клонів за рівнем продукування досліджуваної речовини;
- відбір 1 клону, що відрізняється високим та відтворюваним рівнем продукування досліджуваної речовини;
- розсів відібраного клону (100 колоній), оцінювання колоній за морфологією та рівнем продукування досліджуваної речовини;
- побудова варіаційного ряду та розрахунок статистичних показників (середнє арифметичне, середнє квадратичне відхилення, коефіцієнт варіації) для отриманих колоній;
- повторне оцінювання клонів з підвищеним рівнем продукування, відбір найпродуктивнішого субклубу, його розсів та оцінювання;
- порівняння двох варіаційних рядів та вибір найпродуктивнішого субклубу.

Перші чотири етапи називають «чисткою культури», наступні – «стабілізацією культури».

Підготовка штаму *Bacillus subtilis* до селекційної роботи включає приготування суспензії культури за стандартом каламутності та визначення її титру або КУО, тобто концентрації бактеріальних клітин у ній. Оскільки підготовлена таким чином культура має приблизну концентрацію бактерій, то для визначення її точнішої концентрації використовуються різні методи – нефелометричний, турбідиметричний, метод розведення та розсіву на агаризовані середовища тощо. В нефелометричному і турбідиметричному методах використовуються явища розсіювання або поглинання світла клітинами, що знаходяться в рідкій фазі в завислому стані.

В даній лабораторній роботі концентрація клітин визначається шляхом розсіву суспензії *B. subtilis* на агаризовані середовища з використанням серії розведень.

Розведення проводять в асептичних умовах у пробірках з ватно-марлевими пробками. В кожену пробірку вносять по 5 см³ фізіологічного розчину (ФР), а потім стерильними піпетками виконують послідовне розведення бактерійної суспензії. При цьому, для отримання розведення в 100 разів (10⁻²) з пробірки з суспензією піпеткою переносять 0,05 см³ суспензії в іншу пробірку з 5 см³ ФР, а для отримання розведення в 10 разів (10⁻¹) переносять 0,5 см³ суспензії.

Мета роботи: підготувати суспензію клітин *B. subtilis* заданої концентрації та визначити точну концентрацію клітин у суспензії.

Матеріали та обладнання: добова культура *B. subtilis* на скошеному м'ясо-пептонному агарі; стерильні пробірки з ватно-марлевими пробками для розведень; стерильні пробірки з ватно-марлевими пробками пусті; чашки Петрі з м'ясо-пептонним агаром (МПА); піпетки на 10 (5), 1 (2), 0,1 (0,2) см³; шпатель Дригальського; етанол 96 % для пропалювання шпателя; стерильний фізіологічний розчин (ФР); стандарт каламутності 5·10⁸ кл/см³, термостат на +37°C; маркер по склу.

Хід роботи

Хід лабораторної роботи оформлюється студентами у вигляді блок-схеми у форматі А4 (вертикальні аркуші), перевіряється та оцінюється викладачем на початку заняття і є допуском до виконання роботи. Приклад блок-схеми лабораторної роботи наведено в додатку А.

Всі розчини, посуд, за винятком окремо зазначених випадків - стерильні, всі операції здійснюються в асептичних умовах!

На пробірках з культурами, що залишаються на наступні заняття, обов'язково вказують шифр групи та номер бригади!

Бактеріальну суспензію з орієнтовною концентрацією клітин $5 \cdot 10^8$ кл/см³ готують за стандартом каламутності. Для цього в асептичних умовах стерильною петлею декілька разів переносять клітинну біомасу *B. subtilis* з пробірки з МПА в пробірку з 10 см³ ФР. Візуально порівнюють каламутність отриманої суспензії із стандартом, який перед порівнянням обережно струшують, щоб розчин не потрапив на ватно-марлеву пробку. Якщо каламутність розчину суспензії менша, ніж розчину стандарту каламутності, тоді повторно додають клітинну біомасу у ФР до досягнення потрібної каламутності.

Для визначення точнішої концентрації *B. subtilis*, використовують метод розведень. Для цього отриману суспензію розводять у пробірках із 5 см³ стерильного ФР послідовно в 100 разів (в 10^{-2}), ще раз в 100 разів (в 10^{-4}) та ще раз в 10 разів (в 10^{-5}). При виконанні кожного етапу розведення піпетка змінюється на нову, перед розведенням суспензія в пробірці обережно перемішується, щоб клітини рівномірно розподілились в суспензії, перемішування виконують таким чином, щоб рідина не змочувала ватно-марлеву пробку.

Розведену таким чином суспензію 1:10000 (в 10^{-4}) і 1:100000 (в 10^{-5}) висівають мікропіпеткою по 0,02 см³ на МПА в трьох повторях та обережно розтирають по поживному середовищі пропаленим та охолодженим шпателем. Однією і тією ж мікропіпеткою можна провести висів на чашки Петрі спочатку більшого розведення (1:100000), потім меншого (1:10000).

Чашки Петрі з висіяними розведеннями підписують маркером по обідку кришки: шифр групи і номер бригади, розведення (10^{-4} або 10^{-5}). Чашки Петрі розміщують в термостаті догори дном і інкубують протягом 24 годин при $+37^{\circ}\text{C}$. Пробірку з вихідною суспензією підписують (шифр групи і номер бригади, суспензія *B. subtilis*) і зберігають у холодильнику протягом всіх лабораторних робіт із *B. subtilis*. Пробірки, в яких проводились розведення, віддають на знезараження.

Облік результатів

1. Через 24 години після висіву розведених суспензій *B. subtilis* необхідно підрахувати кількість колоній, що вирости, у всіх чашках Петрі. Після проведення обліку результатів необхідно стерти з чашок Петрі написи, виконані маркером, та передати чашки Петрі на знезараження.
2. У протоколі навести детальний розрахунок концентрації клітин в 1 см^3 суспензії з урахуванням всіх розведень, а також розрахунок середнього арифметичного значення (\bar{X}) та середнього квадратичного відхилення (σ). Концентрацію клітин у суспензії представити у вигляді: $\bar{X} \pm \sigma$, кл/см³.

Середнє квадратичне відхилення розраховується за формулою:

$$\sigma = \pm \sqrt{\frac{\sum (X_i - \bar{X})^2}{n - 1}}.$$

За результатами досліду заповнити таблицю 1.1.

Визначення концентрації клітин *B. subtilis* у суспензії

Показники	Номер чашки Петрі, розведення					
	10^{-4}			10^{-5}		
	1	2	3	1	2	3
Розведення						
Кількість колоній						
Концентрація клітин у суспензії, X , кл/см ³						
Середнє значення \bar{X} , кл/см ³						
Середнє квадратичне відхилення, σ						

3. Проаналізувати отримані результати і зазначити у висновку, чи вдалось за результатами виконання лабораторної роботи отримати суспензію із заданою концентрацією клітин, причини відхилення отриманих значень концентрації від заданої концентрації суспензії.

Контрольні питання

1. Що таке мутації?
2. Що таке спонтанні мутації?
3. Які причини виникнення спонтанних мутацій?
4. Що таке частота мутацій? Яка частота виникнення спонтанних мутацій?
5. Що характеризує середнє арифметичне значення?
6. Яке біологічне значення показника «середнє квадратичне відхилення»?
7. Як розрахувати кількість клітин у вихідній суспензії?
8. Як розвести суспензію в 100 разів? В 40 разів?

Лабораторна робота 2

Отримання мутантних штамів за допомогою УФ-опромінення

Короткі теоретичні відомості

Опромінення ультрафіолетовим світлом – один з найпростіших і найзручніших способів отримання мутантів у мікроорганізмів. Для його проведення придатні будь-які джерела ультрафіолетового світла з випромінюванням у короткохвильовій ділянці (близько 253,7 нм). При цьому оптимальні результати спостерігаються за дози близько 500 ерг/мм².

Ефективність мутагенезу визначається відносною кількістю клітин, що вижили при опроміненні летальними дозами ультрафіолету, що в свою чергу, залежить від джерела опромінення та від умов експерименту.

У популяції бактеріальних клітин, що піддаються дії ультрафіолетових променів (УФ), кожна клітина має деяку вірогідність виживання за даної дози опромінення. Якщо вірогідність складає 0,1, то 10 % популяції буде виживати при цій дозі опромінення. Серед тих, що вижили, кожна бактерія має таку ж вірогідність виживання під дією повторної аналогічної дози. Таким чином, якщо доза подвоюється, то кількість бактерій, що вижили, буде зменшуватись пропорційно добутку вірогідностей ($0,1 \times 0,1$), тобто буде складати 1 % тих, що вижили.

Якщо зобразити цей процес графічно, відкладаючи на вісі ординат кількість клітин, що вижили (N), а на вісі абсцис – час обробки, то отримаємо експоненціальну криву виживання. У напівлогарифмічних координатах (lgN) залежність виживаності від дози опромінення буде представляти собою пряму лінію.

Нахил лінії графіку виживаності у напівлогарифмічних координатах відображає ступінь ураження фотоном УФ-чутливої мішені в клітині. Чим легше уражається мішень, тим крутіший нахил лінії. На нахил, а значить, на ефективність мутагенезу впливають наступні чинники:

1. Густина суспензії. Через те, що ультрафіолет погано проникає у

біологічні тканини, в густій суспензії бактерій ($5 \cdot 10^8$ кл/см³ і більше) деякі клітини екрануються іншими, так що крива виживаності набуває плече. Ефект екранування обумовлює неоднаковий відсоток загибелі клітин. Феномен екранування не проявляється при опроміненні суспензій, що містять менше $1 \cdot 10^8$ бактерій/см³.

2. Характер рідини, в якій суспендуються бактерії для опромінення.

Бульйон сильніше поглинає УФ-радіацію, ніж буферні розчини, тому ефективність дози для бактерій, що суспендовані в бульйоні, знижується. В бульйоні, що піддається опроміненню, також можуть утворюватися отруйні органічні перекиси, які подовжують летальну дію опромінення після фактичного часу дії опромінення.

3. Фізіологічні умови (стан) клітин. Форма кривої виживаності залежить від кількості летальних ударів та від кількості УФ-чутливих мішеней всередині клітини. У великій клітині чутлива до УФ мішень за звичай менша в порівнянні з загальним об'ємом клітини, ніж та ж мішень у маленькій клітині. Багатоядерна клітина може переносити УФ-опромінення, якщо хоча б одно з ядер лишається непошкодженим. При низьких дозах крива виживаності популяції таких багатоядерних клітин після УФ-опромінення буде мати плато, тому що вірогідність того, що кожне ядро у багатоядерній клітині отримає летальний удар, буде мала, і більшість бактеріальних клітин виживе. При вищих дозах опромінення більшість клітин буде отримувати необхідну кількість летальних ударів, і крива виживаності стане експоненціальною.

Найбільша мутагенна активність проявляється при УФ-опроміненні з довжиною хвилі 260 нм, при якій спостерігається максимум поглинання УФ-світла ДНК. Досліди *in vitro* показали, що пурини більш стійкі до хімічних змін, які обумовлені дією УФ-променів, а піримідини можуть змінюватись щонайменше у двох напрямках. Один з них – гідратація, другий - утворення піримідинових димерів. Якщо перша реакція не має важливого біологічного значення, то друга реакція веде до серйозних порушень реплікації ДНК.

Оскільки ультрафіолет – відносно слабкий мутагенний фактор, найкращі результати отримують при виживаності від 0,1 до 1,0 %. Необхідно, за можливості, зменшити ефект фотореактивації. Для цього треба жорстко підтримувати умови обробки ультрафіолетом (без домішок видимого світла) та проводити подальше вирощування бактерій та інші маніпуляції з культурою у повній темряві.

Мета роботи: визначити оптимальний для мутагенезу час обробки ультрафіолетовим опроміненням суспензії *B. subtilis*.

Матеріали та обладнання: суспензія *B. subtilis*; стерильні пробірки з ватно-марлевими пробками для розведень; стерильні пробірки з ватно-марлевими пробками для оброблених суспензій; стерильні чашки Петрі; чашки з МПА; піпетки на 10 (5) см³, 1 (2) см³, 0,1 (0,2) см³; стерильний ФР; секундомір; УФ-опромінювач (хроматоскоп); термостат на + 37°C; шпатель Дригальського; етанол 96 % для прокалювання шпателью; маркер по склу.

Хід роботи

УВАГА! Студент, який здійснює опромінення суспензії, повинен одягти стерильні текстильні або латексні рукавиці. Хроматоскоп розташовується в спеціально обладнаному боксі, студент не повинен дивитись на УФ-лампу під час її роботи у боксі.

Вмикають УФ-лампу (хроматоскоп) за 20–25 хвилин до її використання і встановлюють на відстані 30 см над робочою поверхнею магнітних мішалок.

Приготовану на попередньому занятті суспензію розливають по 1 см³ у стерильні чашки Петрі з стерильними металевими скріпками (3 шт). В кожену чашку додають по 6 см³ ФР.

Якщо з попереднього заняття суспензії не залишилось, необхідно підготувати суспензію *B. subtilis* із концентрацією $5 \cdot 10^8$ кл/ см³ (за стандартом каламутності) відповідно пропису, наведеному в лабораторній роботі 1.

Бактеріальну суспензію опромінюють в чашках Петрі протягом 40 с, 60 с, 80 с. Для цього точно відраховують час за секундоміром від моменту знімання

кришки чашки Петрі до її закриття. В протоколі зазначають точний час опромінення за секундоміром. Чашки Петрі з суспензіями одразу після опромінення загортають у папір та зберігають у темряві.

Опромінені суспензії переносять з чашок Петрі за допомогою піпеток номіналом 10 см^3 в пусті стерильні пробірки з ватно-марлевими пробками, підписують і зберігають у темряві. **Для кожного варіанту опромінення використовується окрема піпетка!**

Для того, щоб визначити концентрацію клітин в опромінених суспензіях, готують розведення у відповідності до таблиці 2.1 піпетками номіналом 2 см^3 . При проведенні розведення піпетка змінюється на нову відразу після виливання суспензії у ФР. Перед розведенням пробірки обережно струшують. Необхідно слідкувати, щоб розчин не змочував ватно-марлеву пробку і клітини рівномірно розподілились в суспензії.

Висів суспензій по $0,02\text{ см}^3$ проводять у відповідності до табл. 2.1, використовуючи при цьому піпетки номіналом $0,2\text{ см}^3$. Внесену краплину суспензії рівномірно розподіляють по поверхні чашки Петрі шпателем.

Таблиця 2.1

Схема проведення розведень суспензії *B. subtilis*, які необхідно приготувати та висіяти на МПА після опромінення УФ

Проба	Час опромінення, с	РОЗВЕДЕННЯ						
		1	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
0	0	+		+		+	+	+
1		+		+	+	+		
2		+		+	+			
3		+	+					

+	- розведення, які необхідно приготувати
+	- розведення, що висіваються у чашки Петрі

Чашки Петрі підписують маркером по обідку кришки: шифр групи і номер бригади, час опромінення, розведення) та розміщують у термостаті догори дном. Чашки Петрі інкубують протягом 24 годин при +37°C.

Пробірки з вихідною суспензією і опроміненими суспензіями, що залишилися, зберігають при 4°C. Пробірки з опроміненими суспензіями загортають у папір для зберігання. Пробірки, в яких виконувались розведення, віддають на знезараження.

Облік результатів

1. Через 24 години проводять підрахунок кількості колоній та заповнюють таблицю 2.2. Після проведення обліку результатів необхідно стерти з чашок Петрі написи, виконані маркером, та передати їх на знезараження.
2. У протоколі навести детальний розрахунок концентрації клітин у 1 см³ суспензії з урахуванням всіх розведень, розрахунок відсотку виживання клітин і дози опромінення. Розрахувати точну концентрацію клітин у контрольній суспензії (без опромінення). Схему розрахунків наведено в додатку Б.
3. Визначити оптимальну дозу опромінення, що спричинює загибель 99,0–99,9 % клітин. Дозу опромінення розраховують, виходячи з припущення, що доза 500 ерг/мм² інактивує 99 % клітин *B. subtilis*.
4. Побудувати графіки на міліметровому папері: відсоток клітин (%), що вижили (N) = f (час опромінення) та lg (N) = f (доза опромінення).
5. Сформулювати висновки, в яких необхідно обґрунтувати вибір оптимального часу опромінення УФ суспензії та дози опромінення. Порівняти побудовані графіки з класичним виглядом графіків: відсоток клітин, що вижили (N) = f (час опромінення) та lg (N) = f (доза опромінення). Класичний вигляд графіків наведено в додатку В (рис. 1, 2).

Таблиця 2.2

**Визначення оптимальної дози опромінення ультрафіолетом суспензії
*B. subtilis***

Проба (позначення)									
Час опромінення, с									
Розведення	до опромінення								
	після опромінення								
Об'єм суспензії, що висівається см ³									
Кількість колоній на чашці, шт									
Концентрація клітин після розведення, кл/см ³									
Концентрація клітин до розведення, кл/см ³									
Концентрація клітин до розведення, середня, кл/см ³									
Відсоток виживання клітин, %									
Доза опромінення, ерг/мм ²									

Контрольні питання

1. Які чинники необхідно враховувати при проведенні досліду з фізичними мутагенами?
2. Чому для проведення мутагенезу з використанням ультрафіолетового опромінювання суспензія клітин готувалась у фізіологічному розчині, а не в іншій рідині?
3. Як можна за кривими виживання визначити ефективність мутагену?
4. Що таке відсоток виживання? Для чого його необхідно знати?
5. Для чого необхідно знати кількість бактерій, що вижили?
6. Для чого необхідно знати кількість клітин до розведення?
7. Як визначаємо в таблиці концентрацію клітин до розведення?
8. Яка послідовність розрахунку концентрації клітин у вихідній суспензії, починаючи з обліку колоній на чашці Петрі?
9. Для чого ви проводите розведення культури?
10. Чому ви готуєте по 2 розведення кожної проби? Чи повинні вони співпадати?

Лабораторна робота 3

Використання хімічних мутагенів для одержання надпродуцентів біологічно активних речовин

Короткі теоретичні відомості

Окрім фізичних мутагенів, для отримання надпродуцентів широко використовуються хімічні мутагени. При обробці хімічними факторами необхідно дотримуватись умов, що сприятимуть максимальному прояву мутагенної активності даної речовини. Найважливішу роль у цьому відношенні має рН розчину, тому обробку проводять в буферних розчинах за найбільш ефективних для даного мутагену значеннях рН.

Серед хімічних мутагенів досить часто використовують азотисту кислоти, яка спричинює окислювальне дезамінування (заміну аміногрупи гідроксильною) азотистих основ ДНК. При цьому порушується правило комплементарності основ і проходить заміна АТ на ГЦ (додаток Г).

Для хімічних мутагенів доза впливу характеризується концентрацією мутагену в суспензії і експозицією при певній температурі.

Мета роботи: визначити оптимальний час обробки суспензії *B. subtilis* азотистою кислотою.

Матеріали та обладнання: суспензія *B. subtilis*; стерильні пробірки з ватно-марлевими пробками для розведень; чашки Петрі з МПА; піпетки на 10 (5) см³, 1 (2) см³, 0,1 (0,2) см³; стерильні розчини (ФР; 0,2 М ацетатний буфер з рН 4,4–4,6; 0,2 М фосфатний буфер з рН 7,0 (додаток Д)); секундомір; термостат на +37°C; шпатель Дригальського; етанол 96 % для прокалювання шпателью; маркер по склу.

Хід роботи

Проводять підготовку суспензії *B. subtilis* з орієнтовною концентрацією клітин $5 \cdot 10^8$ кл/см³ за стандартом каламутності відповідно пропису в лабораторній роботі 1. Також можна використати суспензію, приготовану

на лабораторній роботі № 1.

В пробірку з $5,6 \text{ см}^3$ стерильного ФР вносять $0,2 \text{ см}^3$ суспензії. Ця пробірка – контрольна.

В іншу пробірку з $5,6 \text{ см}^3$ ацетатного буфера (0,2 М; рН 4,4–4,6) вносять $0,2 \text{ см}^3$ суспензії і готують секундомір для контролю тривалості мутагенезу.

Відлік часу обробки починають з моменту потрапляння першої краплі розчину $0,2 \text{ см}^3$ нітриту натрію в суспензію.

Через 1, 3 і 5 хв. із суміші відбирають оброблену суспензію піпетками по $0,5 \text{ см}^3$ і переносять у пробірки з 4 см^3 стерильного фосфатного буфера (0,2 М; рН 7,0) для припинення дії мутагену. ***Для відбору кожної проби використовують окремі піпетки!***

Пробірки підписують, обов'язково вказавши час обробки. Наприкінці лабораторної роботи ці три пробірки залишають на подальше зберігання в холодильнику.

Для визначення концентрації клітин в оброблених суспензіях готують розведення у відповідності до таблиці 3.1 піпетками номіналом 2 см^3 . При проведенні розведення піпетку змінюють на нову одразу після виливання суспензії у ФР. Перед розведенням пробірки обережно струшують, слідкуючи, щоб розчин не змочував ватно-марлеву пробку і клітини рівномірно розподілились в суспензії.

Висівають по $0,02 \text{ см}^3$ вказаних в табл. 3.1 розведень на чашки з МПА, використовуючи при цьому піпетки номіналом $0,2 \text{ см}^3$. Внесену краплину суспензії рівномірно розподіляють по поверхні чашки Петрі шпателем.

Чашки Петрі підписують маркером по обідку кришки (шифр групи, номер бригади, час обробки, розведення), розміщують у термостаті догори дном та інкубують протягом 24 годин при $+ 37^\circ\text{C}$.

Пробірки з вихідною суспензією і обробленими суспензіями, що залишилися, зберігають при $+ 4^\circ\text{C}$.

Схема проведення розведень суспензії *B. subtilis*, які необхідно приготувати та висіяти на МПА після проведення хімічного мутагенезу

Проба	Час, с	РОЗВЕДЕННЯ					
		1	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
0	0	+		+		+	+
1		+		+	+	+	
2		+		+	+		
3		+	+				

+	- розведення, які необхідно приготувати
+	- розведення, що висіваються на чашки Петрі

Пробірки, в яких виконувались розведення, віддають на знезараження.

Облік результатів

- Через 24 години проводять підрахунок кількості колоній та заповнюють таблицю 3.2. Після проведення обліку результатів необхідно стерти з чашок Петрі написи, виконані маркером, та передати їх на знезараження.
- У протоколі навести детальний розрахунок концентрації клітин в 1 см^3 суспензії з урахуванням всіх розведень, розрахунок відсотку виживання клітин. Розрахувати точну концентрацію клітин в контрольній суспензії (без обробки). Результати розрахунків записати у таблицю 3.2.
- Побудувати графіки на міліметровому папері:
 $\text{відсоток клітин (\%)} = f(\text{час обробки})$,
 $\lg N = f(\text{час обробки})$. Виживання клітин має становити 0,01–0,1 %.
- За результатами роботи зробити висновки про оптимальний час обробки суспензії *B. subtilis* HNO_2 , вплив часу обробки HNO_2 на виживання клітин.
 Порівняти побудовані графіки з класичним виглядом графіків, які наведено в додатку В (рис. 3, 4).

Визначення оптимального часу обробки суспензії *B. subtilis* хімічним мутагеном

Проба (позначення)									
Час обробки HNO_2 , хв									
Розведення	до обробки								
	після обробки								
Об'єм суспензії, що висівається, см^3									
Кількість колоній на чашці, шт									
Концентрація клітин після розведення, $\text{кл}/\text{см}^3$									
Концентрація клітин до розведення, $\text{кл}/\text{см}^3$									
Середня концентрація клітин до розведення, $\text{кл}/\text{см}^3$									
Відсоток виживання, %									

5. Зробити висновки про ефективність використання опромінення ультрафіолетом і обробки HNO_2 для отримання мутантних штамів *B. subtilis*.

Контрольні питання

1. Які особливості хімічних мутагенів?
2. Які чинники необхідно враховувати при проведенні досліду з хімічними мутагенами?
3. Які типи мутацій викликають хімічні мутагени взагалі і конкретно азотиста кислота?
4. Що в даній лабораторній роботі використовується в якості хімічного мутагену?
5. Чи може бути мутагеном NaNO_2 ? Чи вірне твердження: «Як хімічний мутаген використовували азотистокислий натрій»?
6. Скільки і як додавали азотисту кислоти у середовище в лабораторній роботі?

7. Чому при роботі з фізичними мутагенами готують розведення вихідної суспензії 10^{-6} , а при роботі з хімічними мутагенами – 10^{-5} ?
8. Яка ефективність фізичних і хімічних мутагенів?
9. Як визначити, який з мутагенів ефективніший: фізичний або хімічний?

Лабораторна робота 4

Виділення ауксотрофних мутантів

Короткі теоретичні відомості

Ауксотрофними мутантами називаються мікроорганізми, що в результаті мутації втратили здатність синтезувати необхідні для їхнього росту сполуки (амінокислоти, вітаміни, азотисті основи) на відміну від *прототрофних* організмів, здатних до їх синтезу.

Частота спонтанного виникнення ауксотрофних мутацій звичайно не перевищує 10^{-5} . Для її підвищення застосовуються різні мутагенні фактори, найбільш ефективними з яких є нітрозосполуки. При обробці популяції клітин нітрозосполуками вдається одержати до 10–12 % біохімічних мутантів. Однак, при проведенні досліджень виникає необхідність виділення серії мутантів певного фенотипу або мутантів за одним геном.

Виділити ауксотрофні мутанти з популяції прототрофів досить складно, тому вдаються до різних методів, що дозволяють збільшити відносну кількість ауксотрофних мутантів у популяції прототрофів. Для підвищення ефективності добору мутантів розроблено ряд спеціальних методів, що можна розділити на 3 групи:

1. Методи тотальної перевірки з використанням пристосувань, що забезпечують пересівання великої кількості колоній, наприклад метод "реплік" Ледерберга.

2. Візуальні методи добору, що використовують "напівзбагачені" необхідними речовинами синтетичні середовища, на яких колонії ауксотрофних мутантів відрізняються від прототрофних колоній меншими розмірами.
3. Методи, які базуються на елімінації з популяції прототрофів, що приводить до підвищення концентрації ауксотрофів.

Найпоширеніший з цих методів – так званий напівселективний метод, запропонований одночасно Ледербергом і Девісом, в якому використовують на дію пеніциліну. У мікроорганізмів пеніцилін пригнічує синтез клітинної оболонки, суттєво не впливаючи на ростові процеси. Тому, якщо суміш ауксотрофних і прототрофних клітин помістити в середовище, що дефіцитне за тими або іншими поживними речовинами і містить летальну дозу пеніциліну, то прототрофи загинуть, як тільки почнуть розмножуватися, а ауксотрофи, які не зможуть рости в цих умовах, залишаться життєздатними

При використанні пеніцилінового методу необхідно дотримуватись ряду умов:

1. Суспензія бактерій, що піддається обробці, повинна містити не більше, ніж 10^7 клітин / см^3 . При використанні концентрованої суспензії продукти лізису клітин, що загинули від дії пеніциліну, будуть виділятися в середовище і слугувати джерелом ростових факторів для ауксотрофів, останні почнуть розмножуватись і загинуть. У суспензіях з концентрацією менше 10^7 клітин / см^3 вміст продуктів лізису недостатній для розмноження ауксотрофів.
2. Тривалість обробки популяції бактерій пеніциліном повинна бути невелика. Найчастіше використовуються концентрації пеніциліну, рівні 2000 од / см^3 при тривалості обробки, що не перевищує двох годин.

3. Бактерії, вирощені на збагаченому середовищі, необхідно перед обробкою пеніциліном проінкубувати у мінімальному середовищі протягом часу, достатнього для 3–4 поділів. Ця процедура необхідна для того, щоб клітини ауксотрофів використали ендogenous метаболіти і не ділилися в середовищі з антибіотиком.

4.1. Метод збагачення ауксотрофними мутантами

Мета роботи: отримати суспензію збагачену ауксотрофами.

Матеріали та обладнання: чашки з МПА; пробірки з РМС; пробірки з поживним середовищем з пеніциліном 10000 од / см³ або ампіциліном 20 мкг / см³; центрифужні пробірки; пробірки з ФР та піпетки для розведення та посівів; качалка; центрифуги; шпатель Дригальського; етанол 96% для прокалювання шпателя; маркер по склу.

Хід роботи

У пробірки з 4 см³ РМС вносять 0,5 см³ суспензії клітин, обробленої мутагеном в оптимальній концентрації або опроміненою оптимальною дозою ультрафіолету, та інкубують протягом 45 хвилин на качалці (шутелі) при +37°C. Після цього додають у пробірки 0,5 см³ поживного середовища з пеніциліном 10000 од / см³ або ампіциліном 20 мкг / см³ та знов інкубують за тих же умов протягом 45 хв.

Після інкубації суспензію асептично переносять у стерильні центрифужні пробірки та центрифугують 10 хв при 5000 об/хв. Осад відмивають стерильною водою, здійснюючи повторне центрифугування за таких же умов. Отриманий осад суспендують в 1 см³ стерильної води, готують розведення (10⁻¹; 10⁻²; 10⁻³) у пробірках з 5 см³ ФР та висівають на чашки Петрі з МПА по 0,02 см³ суспензії з кожної пробірки.

Залишок суспензії заливають рівним об'ємом гліцерину, перемішують та зберігають для наступних дослідів.

Облік результатів

1. Через 24 години підраховують кількість колоній та заповнюють таблицю 4.1. Після проведення обліку результатів необхідно стерти з чашок Петрі написи, виконані маркером, та передати їх на знезараження.

Таблиця 4.1

Результати збагачення культури ауксотрофами

№ чашки	Розведення	Кількість колоній, що вирости

2. Зробити висновки щодо ефективності проведеного збагачення.

4.2. Відбір ауксотрофів

Мета роботи: виділити ауксотрофи *B. subtilis* із суспензії, обробленої хімічним або фізичним мутагенами.

Матеріали та обладнання: чашки Петрі з МС; чашки Петрі МС з метіоніном (Met), чашки Петрі МС з триптофаном (Trp); чашки Петрі з стерильними паличками для переколювання; пуста чашка Петрі для відпрацьованих паличок для переколювання; стерильні штампи; етанол 96 % для прожарювання шпателью; маркер по склу.

Хід роботи

У лабораторній роботі використовуються чашки Петрі з колоніями, отриманими після розсіву суспензій, *B. subtilis*, що піддавались обробці хімічними або фізичними мутагенами. Дані щодо режимів обробки суспензій *B. subtilis* мутагенами занотовують у відповідний рядок таблиці 4.1.

Метод відбитків. Для проведення реплікування методом відбитків кожною бригадою використовуються відібрані на попередніх заняттях по дві чашки Петрі, що містять до 20 окремих колоній *B. subtilis*, оброблених хімічним або фізичним мутагенами. На денці 2-х чашок Петрі з мінімальним агаром

(МС), 2-х чашок Петрі з мінімальним агаром з додаванням метіоніну (МС з Met) і 2-х чашок Петрі з мінімальним агаром з додаванням триптофану (МС з Trp) маркером ставлять мітку (ризку). Кожен студент з бригади проводить реплікування на 3 чашки Петрі з різними середовищами з цього набору (МС, МС з Met, МС з Trp). В асептичних умовах аплікатор розміщують біля газового пальника оксамитовою поверхнею вгору. Чашку Петрі з колоніями, серед яких необхідно виділити ауксотрофи, притискають до поверхні аплікатора, таким чином, щоб відтиск колоній залишився на поверхні аплікатора. Потім до аплікатора притискають чашку Петрі з МС, суміщаючи мітку на аплікаторі і на дні чашки Петрі з МС. Далі до аплікатора притискають чашку Петрі з МС з одним з факторів росту, потім з іншим фактором росту, в обох випадках суміщаючи мітку на аплікаторі і на дні чашок Петрі. На чашках Петрі зазначають шифр групи, номер бригади і прізвище студента, що проводив реплікування. Інкують чашки Петрі протягом ночі при $+37^{\circ}\text{C}$, розміщуючи в термостаті чашки Петрі догори дном.

Метод переколювання. Для проведення переколювання кожною бригадою використовуються відібрані на попередніх заняттях по дві чашки, що містить 20–100 окремих колоній *B. subtilis*, оброблених хімічним або фізичним мутагенами (вихідні чашки). Необхідно попередньо маркером по склу накреслити на дні цих чашок Петрі (МС, МС з Met, МС з Trp) сітку, яка утворює 60 клітинок. На дні чашок Петрі в накресленій сітці в крайній лівій клітинці вгорі позначають початок відліку пересіву (позначають № 1). Тотальний пересів окремих колоній здійснюють за допомогою стерильних дерев'яних загострених паличок. В асептичних умовах стерильною дерев'яною паличкою доторкаються до поверхні першої колонії у вихідній чашці Петрі, потім цією ж паличкою здійснюють посів (доторкаються) в клітинку № 1 в чашці Петрі з МС, МС з Met, МС з Trp. Дерев'яну паличку відкладають в окрему чашку Петрі для відпрацьованих дерев'яних паличок. Пересів кожної колонії здійснюють окремою паличкою. Кожна бригада здійснює

переколювання на 3 чашки Петрі з трьома різними середовищами. Кожен студент з бригади пересіває (переколює) по 30 колоній у кожную чашку з набору (МС, МС з Met, МС з Trp). Інкують чашки Петрі протягом ночі при + 37°C, розміщуючи в термостаті догори дном.

Облік результатів

1. Через 24 години підраховують кількість колоній та заповнюють таблицю 4.2. Після проведення обліку результатів необхідно стерти з чашок Петрі написи, виконані маркером, та передати їх на знезараження.

При обліку результатів, отриманих методом відбитків, чашки Петрі (МС, МС з Met, МС з Trp) необхідно розмістити таким чином, щоб мітки на всіх 3 чашках співпадали і порівняти розташування колоній. При обліку результатів, отриманих методом переколювання, колонії на чашках Петрі (МС, МС з Met, МС з Trp) необхідно порівняти, суміщаючи початок відліку пересіву (клітина №1) у всіх 3 чашках. Для обох методів замалювати схему розташування колоній у чашках Петрі.

2. Підрахувати кількість колоній, які вирости на всіх трьох середовищах. Звернути увагу на колонії, які вирости на середовищі з відповідним фактором росту і не вирости на мінімальному середовищі. Отримані результати внести у таблицю 4.2. Відмітити на зворотному боці чашок МС з Met і МС з Trp ті колонії, які не вирости на чашках з мінімальним середовищем. Це – можливі мутанти.

3. Колонії, що є гіпотетичними мутантами, необхідно відсіяти на пробірки зі скошеним агаром з відповідним фактором росту. Одночасно ці ж колонії засіяти штрихом на відповідний сектор чашки Петрі з МС. Колонії, які проростуть на МС, відбраковують, а колонії, які виростуть на середовищі з фактором росту і не виростуть на МС, є потенційними ауксотрофами. За необхідності корегують результати у таблиці 4.2.

Виділення ауксотрофних мутантів *B. subtilis*

Показник		Метод відбитків		Метод переколювання
Прізвище та ім'я студента				
Вихідні дані щодо обробки суспензії <i>B. subtilis</i> мутагенами (тип мутагенезу, час обробки, розведення)				
Кількість колоній	при культивуванні на мінімальному середовищі			
	при культивуванні на середовищі з додаванням фактору росту метіоніну			
	при культивуванні на середовищі з додаванням фактору росту триптофану			
Відсоток ауксотрофних мутантів				
Номери гіпотетичних ауксотрофів				

4. За результатами роботи зробити висновки про результати відбору ауксотрофів *B. subtilis*. Скориставшись таблицею генетичного коду, висловити припущення щодо того, чому для відбору ауксотрофів до складу поживних середовищ додавали амінокислоти метіонін і триптофан?

Контрольні питання

1. В чому полягає метод збагачення?
2. Які методи збагачення мутантами найчастіше використовуються?
3. Як визначити, пройшло збагачення чи ні?
4. Які результати повинні бути отримані в результаті використання методу збагачення?
5. Якщо на контрольному середовищі виросло 20 колоній, скільки повинно бути колоній на середовищах МПА та МС після збагачення (більше чи менше), щоб стверджувати, що збагачення відбулось?
6. Як можна судити про ефективність збагачення?

7. Як розрахувати ефективність збагачення?
8. Як проводити облік результатів при використанні методу переколювання та методу реплікування?
9. В чому різниця між методами переколювання та перепечатування і що спільного?
10. Для чого пересіваються гіпотетичні мутанти на мінімальне середовище та середовище з факторами росту?

Лабораторна робота 5

Аналіз штамів, отриманих у результаті генетичного конструювання *in vivo*

Короткі теоретичні відомості

Після виділення ряду біохімічних мутантів і визначення потреби цих мутантів у якомусь продукті (амінокислота, пурин, піримідин або вітамін, тощо) можна встановити точніше місце порушення біохімічного ланцюга. Якщо є серія генетично неідентичних мутантів, що вимагають для росту один і той же кінцевий продукт, то, використовуючи результати щодо живильних потреб, накопичення проміжних продуктів цими мутантами, а також результати *тесту на синтрофізм* (симбіотичне живлення) можна встановити біохімічний ланцюг, в результаті якого в клітині синтезується даний кінцевий продукт.

Групу мутантів, що потребують для свого росту певний кінцевий продукт обміну, спочатку розділяють на основі двох тестів – тесту на симбіотичне живлення і тесту на накопичення проміжних продуктів. Обидва тести базуються на припущенні, що одинична мутація буде зачіпати тільки одну стадію в основному ланцюзі обміну.

Метод дослідження синтрофізму мутантів із потребою в одному і тому ж кінцевому продукті базується на явищі внутрішньоклітинного накопичення і

дифузії в середовище росту проміжних продуктів одного і того ж біосинтетичного процесу. Речовина, що накопичується одним мутантом, виділяється в середовище, де її починає утилізувати інший мутант, у якого блокована більш рання стадія синтезу. З іншого боку, мутанти, у яких блокований кінцевий етап синтезу, можуть підтримувати ріст усіх мутантів, у яких порушений якийсь із попередніх етапів. За допомогою дослідів по синтрофізму можна розташувати мутанти в порядку послідовності етапів біосинтезу, але цей метод не дає ніякої інформації про хімічну природу проміжних продуктів.

На рисунку 5.1 показана типова чашка, засіяна штрихом чотирма ауксотрофними штамми.

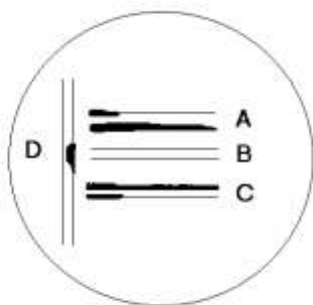


Рис. 5.1. Виявлення синтрофізму шляхом розсіву петлею

По зонах росту видно, що штам В забезпечує ріст штамів А, С та D і що штам D підтримує ріст штамів А та С. Таким чином, точки блока шляху біосинтезу у мутантів А та С передують блоку у мутанта D, що у свою чергу передує блоку у мутанта В. З цього можна зробити висновок, що етапи біосинтезу були наступними: **(А, С) → D → В.**

Порядок утворення речовин у мутантів А та С можна визначити при аналізі інших чашок.

Якщо мутант виник в результаті мутації, що пов'язана з заміною основ, то він можна ревертувати під впливом відповідного мутагену, тобто виникає зворотна мутація, що повертає мікроорганізм до вихідного типу.

Окрім “справжніх” ревертантів може виникнути багато “фенотипових” ревертантів, які своєю появою зобов’язані мутаціям в інших локусах. Наприклад, мутанти із зсувом рамки зчитування можуть ревертувати за рахунок іншої мутації зсуву рамки зчитування, розташованої поблизу з першою. В результаті відновлюється правильне зчитування триплетів. Мутанти з заміною основ, особливо нонсенс – мутанти, можуть ревертувати за рахунок супресорних мутацій в різних генах, що кодують синтез т-РНК. Завдяки таким супресорним мутаціям стає можливою трансляція зміненою молекулою т-РНК нонсенс-кодона в гені, що кодує білок. Цим хоча б частково виправляється перша мутація.

У всіх цих випадках ревертантів можна отримати прямим відбором, висіваючи велику кількість вихідного мутантного штаму на середовище без того метаболіту, який потребує штаму для свого росту.

Запропонований метод аналізу зворотних мутацій за допомогою *дисків з паперу, що оброблені різними мутагенами*, дозволяє не тільки виявити бактерії з зворотними мутаціями, але й отримати певну інформацію щодо природи вихідної мутації. Порівнюючи ефективність, з якою різні мутагени обертають ту або іншу мутацію, можна судити про те, що лежить в її основі – транзиція (трансверсія) або зсув рамки зчитування. Здатність мутації ревертувати під дією будь-якого мутагену свідчить про те, що ця мутація точкова, а не результат делеції, інверсії або іншого типу хромосомних аберацій.

Для того, щоб відрізнити повні ревертанти від часткових, оцінюють їх швидкість росту на середовищі, в якому відсутні відповідні компоненти. З чашки, в якій ставилась проба з паперовими дисками, відбирають колонії різних розмірів, наносять їх штрихами на мінімальних агар для очищення від сторонніх мутантів і проводять посів відповідних розведень на мінімальний агар. Після 2–3 діб культивування визначають відносні розміри колоній. Часткові ревертанти та супресорні штами, як правило, мають колонії значно менших розмірів. В деяких випадках повні ревертанти можна відрізнити за

чутливістю до того або іншого інгібітору обміну речовин: колонії різних штамів з зворотними мутаціями висівають прямо на мінімальний агар з відповідним інгібітором і порівнюють швидкості їх росту з швидкостями росту цих же колоній на мінімальному агарі без інгібітору.

Здатність до зворотного мутування лежить в основі методу визначення мутагенності за Еймсом. Цей метод дозволяє виявити потенційну канцерогенність невідомої речовини, вимірюючи її мутагенність у бактеріальній тест-системі. Речовину вважають немутагенною, якщо 1 мг цієї речовини при включенні в агар не дає збільшення зворотних мутацій у 2 рази в порівнянні з фоном спонтанних зворотних мутацій.

Мета роботи: встановити розташування блоків у ланцюзі біосинтезу для досліджуваних ауксотрофів *B. subtilis*, дослідити стійкість отриманих мутацій *B. subtilis*.

Матеріали і обладнання: стерильний буферний розчин; пробірки; чашки Петрі з МС; досліджувані мутагени (гідроксиламін, MnCl_2 , HNO_2 , конго червоний, H_2O_2 або інші).

5.1. Тест на синтрофізм

Хід роботи

Для виконання роботи кожна бригада отримує чотири пробірки із суспензіями клітин мікроорганізмів-ауксотрофів *B. subtilis* (концентрація клітин в суспензії складає 10^9 кл/см³). Необхідно внести в таблицю вихідні дані щодо отриманих зразків (тип мутагену, час обробки).

На дні чотирьох чашок Петрі маркером по склу відповідно до шаблону і рис. 5.2 розкреслюють для чотирьох штамів по дві коротких паралельних риски довжиною не менше за 2,5 см. Досліджувані штами необхідно пронумерувати як показано на рис. 5.2.

Мікробіологічною петлею необхідно захопити суспензію з першої пробірки і провести нею дві коротких паралельних риски на чашці з мінімальним агаризованим середовищем відповідно до нанесеної на дні чашки схеми.

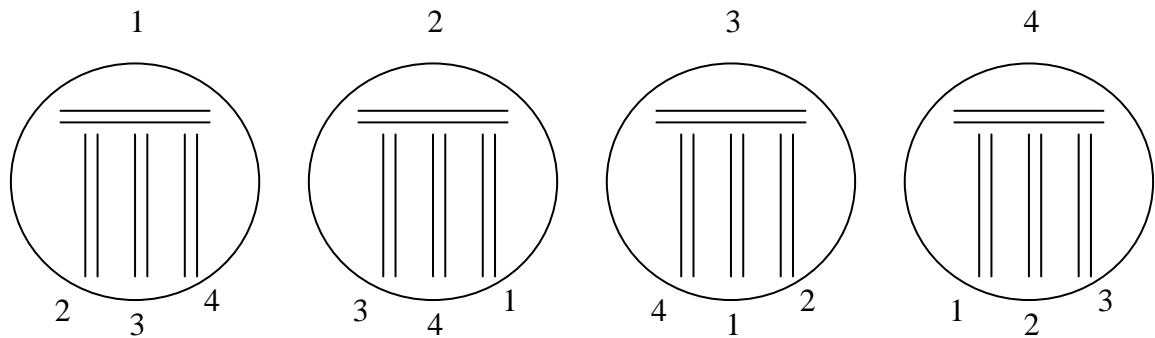


Рис. 5.2. Схема засіву чашок з мінімальним середовищем для проведення тесту на синтрофізм

Аналогічно нанести решту штамів-мутантів, проводячи риски перпендикулярно до першої на відстані 3 мм. Так само засіяти ще три чашки, використовуючи кожний з штамів для нанесення першої риски (рис. 5.2).

Чашки підписати та інкубувати протягом 24 годин при $+37^{\circ}\text{C}$, розташовуючи в термостаті дном догори.

Облік результатів

1. Проаналізувати розташування зон росту на кожній чашці та схематично замалювати характер росту відповідно до рис. 5.1.
2. Виходячи з отриманих даних, зробити висновки щодо розташування блоків у даному ланцюзі біосинтезу.

Контрольні питання

1. Що таке генетичний блок?
2. Як ідентифікувати генетичний блок?

3. Як обійти генетичний блок?
4. Що таке ауксотроф?
5. Для чого використовують тест на синтрофізм?
6. В чому полягає принцип метода?
7. На якому середовищі вирощують досліджувані штами?
8. Чому на мінімальному середовищі штами ростуть, якщо вони ауксотрофи?

5.2. Визначення стійкості отриманих мутацій (реверсії) та повноти реверсії (повноти генетичного блоку)

Хід роботи

1. На дні чотирьох чашок Петрі маркером по склу відповідно шаблону позначити **місця розміщення** просочених мутагенами паперових дисків: вгорі – H_2O , далі за годинниковою стрілкою гідроксиламін, конго червоний, MnCl_2 , H_2O_2 , HNO_2 . Висіяти по $0,2 \text{ см}^3$ суспензії мутантів у чашки з мінімальним агаром, розлитим товстим шаром (по 30 см^3), розподілити по поверхні шпателем. Після підсихання поверхні стерильним пінцетом розмістити на визначених місцях стерильні диски з фільтрувального паперу діаметром до 1 см, змочені одним з розчинів досліджуваних мутагенів: дистильована вода (контроль), гідроксиламін, конго червоний, MnCl_2 , H_2O_2 , HNO_2 тощо. Інкубувати чашки **кришками догори** протягом 24 годин при $+ 37^\circ\text{C}$, доки колонії не стануть легко помітними.

2. З чашки, в якій ставилася проба з паперовими дисками, відібрати окремі колонії, що ревертували, від різних дисків або вихідні мутанти, внести їх в 1 см^3 ФР, суспендувати та висіяти штрихом секторами на мінімальне середовище (або на середовище з додаванням субоптимальної дози фактору росту). Інкубувати протягом 6 діб при $+ 37^\circ\text{C}$, вимірюючи кожні 2 дні діаметри 10-15 колоній кожного штаму. Для порівняння нанести суспензію вихідного прототрофного штаму. Результати внести в таблицю 5.1.

Результати тесту на повноту реверсії

Досліджувана речовина	Специфічність мутагенної дії досліджуваної речовини (довідкові дані)	Діаметр зони росту навколо диску

Облік результатів

1. Результати досліджу на стійкість мутацій замалювати та проаналізувати. Необхідно визначити, навколо яких дисків з мутагенами присутній або відсутній ріст *B. subtilis*, присутність окремих колоній.
2. Результати досліджу на повноту реверсії занести в таблицю 5.1.
3. Для використаних мутагенів виписати типи мутацій, які вони викликають (додаток Г), висловити припущення щодо характеру, стійкості отриманих мутацій та повноти реверсії.

Контрольні питання

1. Що таке реверсія?
2. Реверсія і супресія. В чому різниця і що спільного між цими поняттями?
3. Що необхідно зробити, щоб впевнитись, що мутації стійкі?
4. Яка мутагенна дія використаних в досліді речовин?
5. Як проводити облік результатів на стійкість мутацій?
6. Про що дозволяє судити тест на стійкість мутацій?
7. Як за цим тестом можна визначити характер мутацій?
8. Чи вірне твердження : «Оцінка реверсивності дала негативний результат, значить мутація, що виникла, є делеційною»?
9. Чи вірне твердження : «Хлорид марганцю викликає реверсії генотипів та фенотипів»?

10. Чи вірний термін: «Ревертантні мутанти»?

11. Яким чином можна судити про повноту реверсії?

12. Чи вірне твердження: «Колонії не вирости, що свідчить про неповноту реверсії»?

13. Вкажіть механізм мутагенної дії наступних речовин: NH_2OH (гідроксиламін), $\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$ (фенол), MnCl_2 (хлорид марганцю), NaNO_2 (нітрат натрію), NaHCO_3 (гідрокарбонат натрію), H_2O_2 (перекис водню).

ВИМОГИ ДО ОФОРМЛЕННЯ ПРОТОКОЛІВ

Кожна лабораторна робота оформлюється студентами у вигляді протоколу. Протоколи і блок-схеми дослідів оформлюють на білих аркушах паперу формату А4 або аркушах паперу в клітинку формату А4 з обох сторін. На початку заняття студенти надають викладачеві на перевірку протокол, який повинен містити номер та назву лабораторної роботи, мету, матеріали і обладнання та блок-схему дослідів. Приклад блок-схеми для лабораторної роботи № 1 наведено в додатку А. В блок-схеми вказується назва і об'єм розчинів, що вносяться, вид лабораторного посуду, отримане розведення, умови культивування чи обробки фізичним чи хімічним мутагеном. Вздовж стрілок вказують об'єм розчинів, які переносять, зазначають хімічний посуд, що використовується, зразки, які потрібно віддати на зберігання або знезараження. Зверніть увагу, що інформація щодо розведень (табл. 2.1, табл. 3.1) також розписується у вигляді блок-схеми. Під час роботи блок-схема прикріплюється на робоче місце.

У ході виконання експерименту студент має відзначати всі особливості і відхилення від стандартної методики і причини змін. Допуск до роботи студент отримує після перевірки викладачем наявності оформленого протоколу попередньої лабораторної роботи, блок-схеми дослідів та теоретичних знань, що стосуються даної роботи. За результатами виконання кожного етапу роботи

студент допускається (або не допускається) викладачем до виконання наступного етапу робіт.

На основі отриманих результатів студент робить висновки і надає рекомендації щодо подальшої роботи. Аркуші протоколу в межах однієї лабораторної роботи нумеруються, скріплюються степлером і збираються у файли та папку-швидкозшивач. Титульний аркуш наведено в додатку Е.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Маниатис Т., Фрич З., Самбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. – М.: Мир. – 1964. – 480с.
2. Девис Р., Бодстайн Д., Рот Дж. Методы генетической инженерии. Генетика бактерий. – М.: Мир. – 1964. – 176 с.
3. Hopwood D.A., Bibb H.J., Chater K.P. et al. Genetic manipulation of *Streptomyces*: a laboratory manual. – The John Innea Foundation, Horwioh, England. – 1989. – 560 p.
4. Сборник методик по генетике микроорганизмов / Под ред Р. Клауса, У. Хейса. – М.: Медицина. – 1970. – 248 с.

Приклад оформлення блок-схеми до лабораторної роботи 1

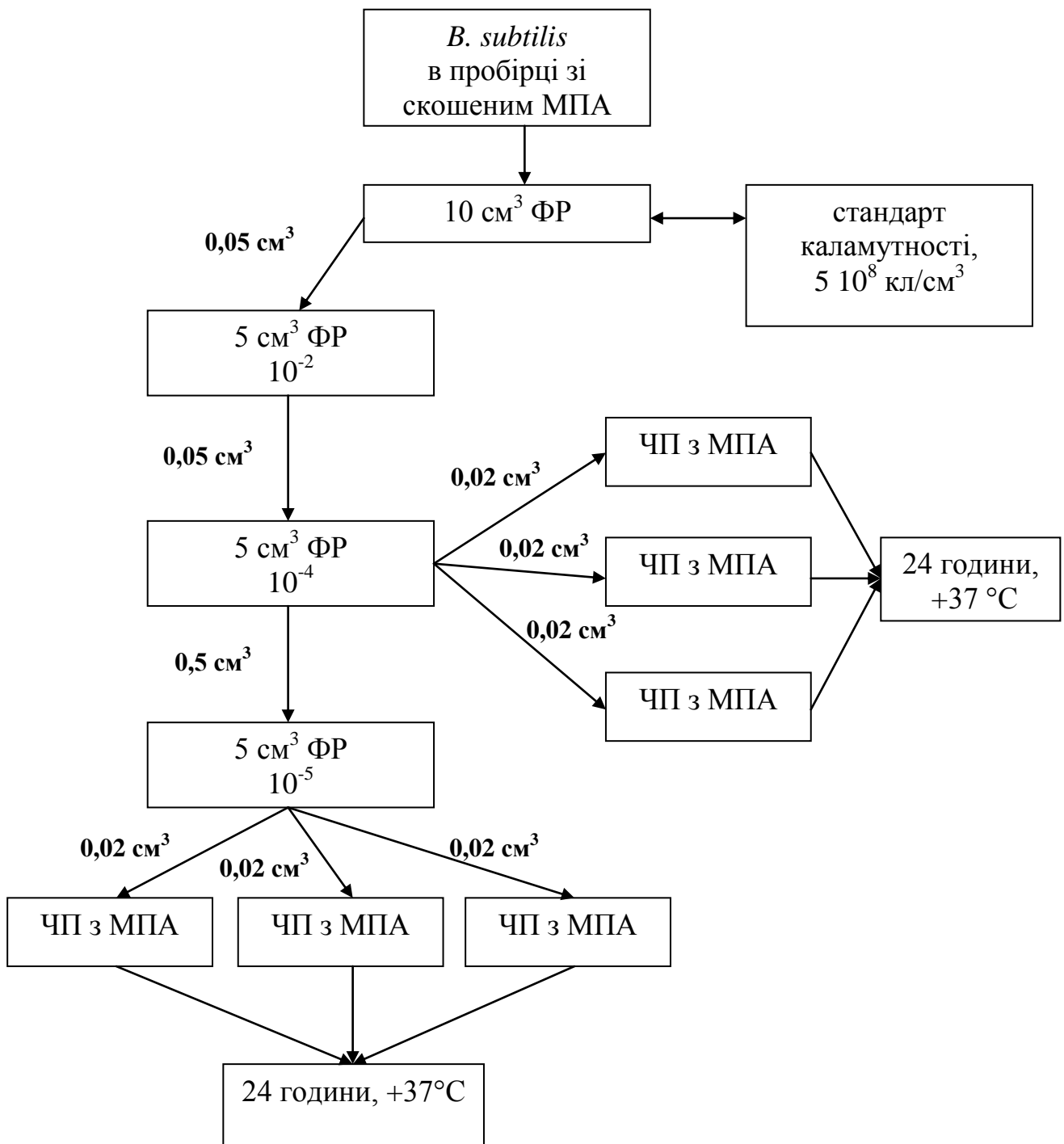


Схема розрахунків для заповнення таблиці 2.2 (фізичний мутагенез)

1. 1. Перерахунок кількості колоній, що вирости на МПА (КУО) в концентрацію кл/см³.

Якщо об'єм суспензії, яку вносили на МПА був 0,02 см³ то концентрація бактерій:

0,02 см³ – n колоній

1 см³ – x₁ кл/см³

2. Концентрація клітин після обробки.

Якщо це висів розведення 10⁻⁵

$x_2 = x_1 \cdot 10^5$ кл/см³

3. Концентрація клітин до обробки:

3.1) для досліду: $x_3 = x_2 \cdot 7$ (в чашці Петрі 6 см³ ФР + 1 см³ суспензії).

3.2) в контролі концентрація клітин до розведення:

якщо з вихідної суспензії відразу готували розведення, тоді розведення до обробки складає 1;

якщо перед першим розведенням контролю у 10⁻² була додаткова пробірка з 5 см³ ФР + 1 см³ суспензії, тоді

$x_3 = x_2 \cdot 6$;

4. Розрахунок відсотку клітин, що вижили, N, %

приклад:

концентрація клітин в контролі 4,5 10⁸ кл/см³ – 100 %

концентрація клітин в досліді 3,2 10⁶ кл/см³ – y₁, %

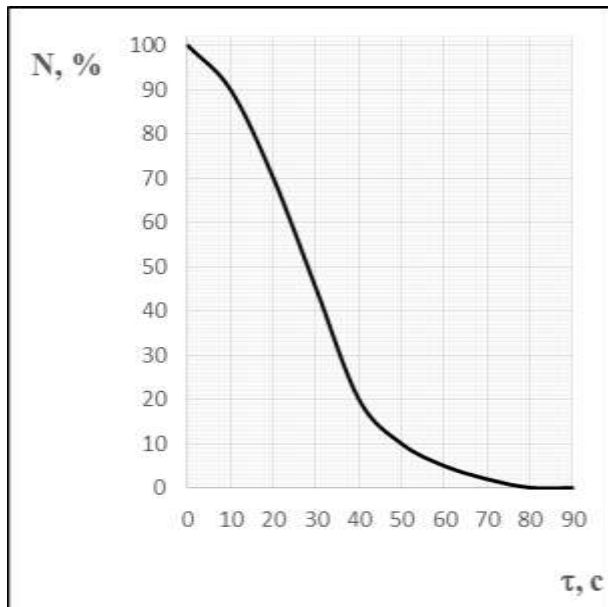
для 40 с – y₁, 60 с – y₂, 80 с – y₃.

5. Розрахунок дози опромінення

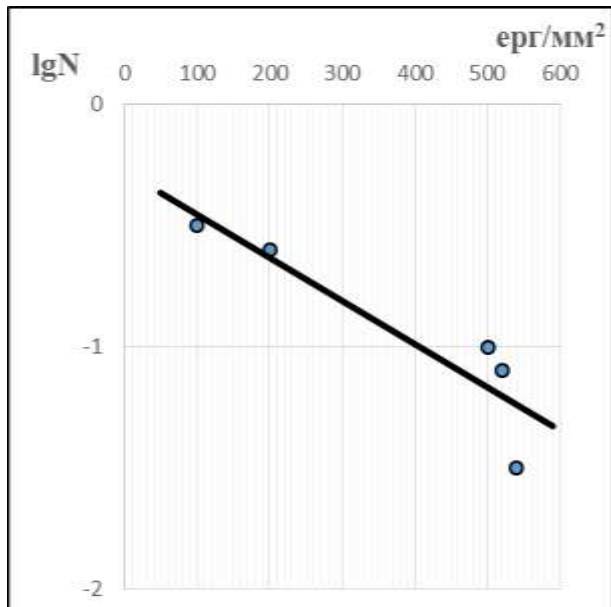
500 ерг/мм² – 99 % інактивованих клітин

доза опромінення в досліді z₁ ерг/мм² – (100 % – y₁).

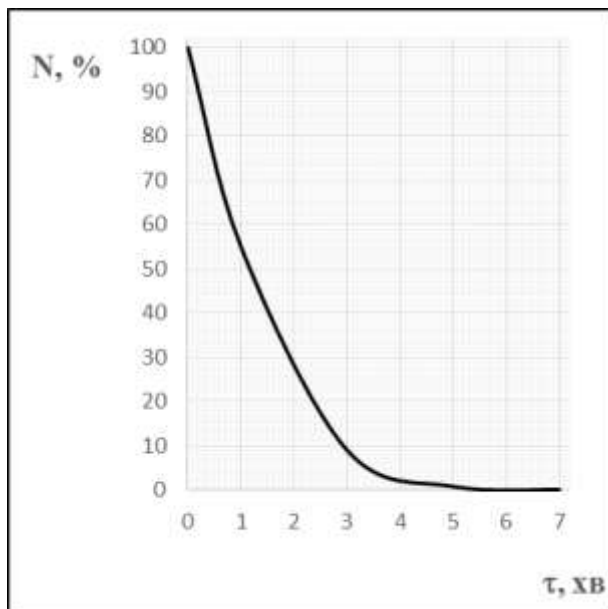
Приклади класичних графіків залежності виживаності культур від часу та дози обробки фізичним та хімічним мутагеном



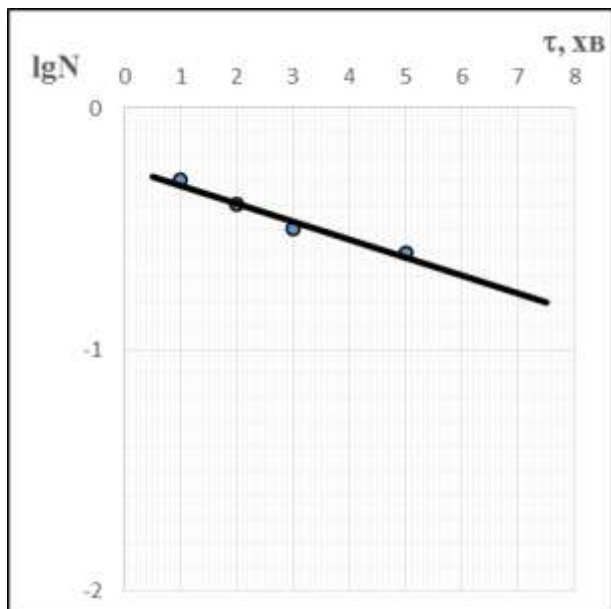
Вплив тривалості УФ-опромінення на виживаність культури *B. subtilis*



Логарифмічна залежність виживаності культури *B. subtilis* від дози УФ-опромінення



Вплив тривалості обробки суспензії HNO_2 на виживаність культури *B. subtilis*



Логарифмічна залежність виживаності культури *B. subtilis* від часу обробки HNO_2

Механізм дії деяких хімічних мутагенів

HNO₂

- дезамінує Г до ксантину (це основа «без сенсу»);
- дезамінує А до гіпоксантину;
- дезамінує Ц до У;
- в ДНК У-А призводить до транзиції ГЦ→АТ;
- гіпоксантин може викликати зворотню транзицію АТ→ГЦ.

H₂O₂

- реверсії до прототрофності по аденіну та інозиту;
- перекиси індуюють розриви хромосом за рахунок хімічних реакцій, що подібні до таких які виникають під впливом рентгенівських променів.

MnCl₂

- хромосомні перебудови;
- мутації до стрептоміцин резистентності, яка залежить від температури фази росту бактеріальної культури, складу клітинної стінки, сольового розчину, що використовується для відмивання мутагену. Солі сприяють виникненню хромосомних перебудов під впливом інших агентів або самі їх індуюють.

Фенол

- руйнує ДНК опосередковано – або утворюючи радикали та перекиси, або впливаючи на ферменти або інші білки;
- фрагментація хромосом.

Гідроксиламін NH₂OH

- Замість полі Ц вставляється полі А;
- транзиції від ГЦ до АТ

Акридинові барвники

- утворення Т димерів;
- руйнування залишків Г.

**ПРОПИСИ ПІДГОТОВКИ СЕРЕДОВИЩ ТА РОЗЧИНІВ, ЩО
ВИКОРИСТОВУЮТЬСЯ В ЛАБОРАТОРНОМУ ПРАКТИКУМІ**

1. **Мінімальне середовище для бактерій (МС):** до 1 дм³ дистильованої води додають $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ – 6 г; KCl – 4 г; K_2SO_4 – 1 г; MgSO_4 – 0,025 г; цитрата амонію (NH_4OH – 2,5 см³; лимонної кислоти 40% – 4,5 см³). Добре перемішують до повного розчинення солей та автоклавують.
2. **Ацетатний буфер 0,2 М, рН 4,4:** готують два розчини: 0,2 М оцтової кислоти (5,7 см³ льодяної оцтової кислоти на 500 см³ дистильованої води); 0,2 М ацетат натрію (13,6 г на 500 см³ дист. води), які автоклавують окремо, безпосередньо перед використанням стерильно зливають рівні об'єми.
3. **Фосфатний буфер 0,2 М, рН 7,0:** на 1 дм³ дистильованої води 10,5 г K_2HPO_4 та 4,5 г KH_2PO_4 . Добре перемішують до повного розчинення солей та автоклавують.
4. **Фізіологічний розчин:** на 1 дм³ дистильованої води 9 г NaCl . Добре перемішують до повного розчинення солі та автоклавують.

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ ТА НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ
«КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ ІМЕНІ ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО»

Лабораторні роботи з дисципліни
«Основи генетичної та клітинної інженерії»

Виконав:

студент 4 курсу, групи БТ-___/БМ-___

_____ Іванов І.І.

(підпис)

№ залікової _____

Перевірив:

к.т.н., ст.викладач каф. пром.

біотехнології

Тітова Л.О.

ст.викладач каф. пром.

біотехнології

Ліновицька В.М.

Київ
КПІ імені І. Сікорського 20___

Питання для самоконтролю за змістовним модулем

«Генетичне конструювання *in vivo*»

До лабораторної роботи 1

1. Які характеристики спонтанного мутаційного процесу?
2. Яка частота мутацій при спонтанному мутаційному процесі?
3. Що таке напрям мутації?
4. Що значить реверсія?
5. Які мутації називаються супресорними?
6. Які основні способи підвищення синтезу цільового продукту Ви можете запропонувати?
7. Вам необхідно підвищити вихід цільового продукту. Як Ви будете це здійснювати?
8. Які існують методи підвищення продуктивності штамів?
9. Для селекції промислового продуцента БАР Вам необхідно вибрати продуцент. Чим Ви будете керуватися у Вашому виборі?
10. Вам необхідно провести штучний добір без застосування мутагенів. Як ви визначите доцільність його застосування?
11. Як Ви будете здійснювати підготовку вихідного штаму до селекційної роботи?
12. Вам необхідно «почистити» культуру. Як Ви це будете робити?
13. Вам необхідно стабілізувати культуру. Ваші дії?
14. Які переваги і недоліки ступінчатого добору?
15. Якщо вихідна культура не продукує речовину, яка Вас цікавить, які методи селекційної роботи Ви запропонуєте?
16. Вам необхідно застосувати індукований мутагенез. Чим Ви будете керуватися у виборі мутагену?
17. Вам вдалося підвищити продуктивність штаму за цільовим продуктом, застосовуючи індукований мутагенез. Які механізми в метаболізмі клітини можуть це забезпечити?

18. Вам необхідно створити штам хересних дріжджів, стійкий до високих концентрацій спирту. Як ви це будете здійснювати?

До лабораторної роботи 2

1. Що таке мутаген?
2. Наведіть класифікацію мутагенів.
3. Від чого залежить ефективність дії мутагену?
4. Класифікація фізичних мутагенів.
5. Які мутації можуть викликати фізичні мутагени?
6. Який тип мутацій викликає іонізуюче опромінення? Ультрафіолетове опромінення?
7. Який механізм дії іонізуючого опромінення? Ультрафіолетового опромінення?
8. Що можна сказати про чутливість до дії іонізуючого опромінення: а) у різних форм живого; б) у різних органоїдів клітини; в) у клітин, що знаходяться на різних стадіях клітинного циклу; г) в різних тканинах; д) у клітин різного віку; е) у клітин різного фізіологічного стану (молоді, старі)?
9. Чи залежить глибина ураження від генотипу?
10. Від чого залежить частота мутацій, що виникають?
11. Чи вірне твердження: «Ультрафіолетове проміння – відносно слабкий мутаген»?
12. Чому ультрафіолетове опромінення не застосовується для еукаріотичних клітин?
13. Для яких об'єктів з найбільшим мутагенним ефектом застосовується ультрафіолетове опромінення?
14. Що можна сказати про проникаючу здатність ультрафіолетового опромінення?
15. Чому найбільший мутагенний ефект УФ-опромінення спостерігається при $\lambda=260$ нм?
16. Як впливає на кількість мутацій час, за який отримана певна доза, та кількість опромінь?

До лабораторної роботи 3

1. Як полегшити добір мутантів після впливу мутагену?
2. Серед отриманих мутантів Вам необхідно відібрати мутантів з бажаними властивостями. Як це здійснити?
3. Вам необхідно провести відбір випадкових мутацій. Як це здійснити?
4. Ви вибрали для відбору мутантів метод відбору за кількісними ознаками серед мутантів з певним фенотипом. Які його переваги, недоліки, сфери застосування.
5. Ви вибрали для відбору мутантів метод відбору за кількісними ознаками серед мутантів з визначеним фенотипом. Як Ви будете його здійснювати?
6. Вам необхідно полегшити добір ауксотрофних мутантів. Які методи Ви запропонуєте?
7. Вам необхідно провести добір серед мутантів, резистентних до антибіотиків. Як це зробити?
8. Як можна визначити морфологічні мутації при проведенні добору?
9. Як можна використати морфологічних мутантів при відборі продуцентів після мутагенної дії?
10. Транспозонний мутагенез і хімічний мутагенез. Що б Ви вибрали для селекційної роботи?
11. Ви хочете провести транспозонний мутагенез. Як Ви будете це здійснювати?
12. Вам необхідно здійснити перенесення транспозону. Які вектори Ви будете використовувати?
13. Вам необхідно позбутися вектора при здійсненні транспозонового мутагенезу. Що Ви будете робити?
14. Що таке подвійні мутанти і у чому їх цінність у селекції?
15. Які існують механізми регуляції метаболізму у прокаріотичній клітині?
16. Як можна регулювати метаболізм прокаріотичної клітини на рівні біосинтезу білкових посередників?
17. Як можна регулювати метаболізм прокаріотичної клітини на рівні функціонування білкових посередників?

До лабораторної роботи 4

1. Які фактори можуть впливати на функціонування систем транспорту?
2. Яким чином можна змінювати роботу систем, що забезпечують перенесення речовин через мембрани?
3. Яким чином можна враховувати знання механізмів регулювання транспорту речовин через клітинні мембрани для підвищення їх вмісту в клітині?
4. Яким чином ліпіди можуть впливати на транспорт речовин через мембрани?
5. На яких етапах може здійснюватись регуляція експресії генів у прокаріот?
6. Як може здійснюватись регуляція експресії генів у еукаріот?
7. Які властивості РНК-полімерази можуть впливати на ефективність транскрипції?
8. Чи впливає на ефективність транскрипції у прокаріот послідовність нуклеотидів у опероні?
9. Що значить “ефективний промотор”?
10. Яким чином можна регулювати транскрипцію?
11. Що таке атенуатор і яка його роль в регуляції експресії генів?
12. У середовищі достатня кількість амінокислот. Яким чином це вплине на механізм атенуації і до чого призведе?
13. У середовищі дефіцит певної амінокислоти. Яким чином це вплине на механізм атенуації і які будуть наслідки?
14. Вам необхідно підвищити біосинтез триптофану. Що Ви будете робити для цього?
15. Внутрішньоклітинний вміст амінокислоти знизився. Яким чином можна підвищити її біосинтез?
16. Що таке суворий амінокислотний контроль синтезу РНК?
17. Яким чином здійснюється суворий амінокислотний контроль?
18. Гуанозінтетрафосфат (ффГфф). Його функції в клітині.
19. Вам необхідно підтримувати концентрацію ффГфф на певному рівні. Яким чином Ви можете цього досягти?

20. Яким чином використовують ффГ фф в селекції штамів – продуцентів БАР?
21. Яким способом можна здійснювати регуляцію швидкості біохімічних реакцій?
22. Ви знаєте механізм біосинтеза БАР, вихід якого хочете підвищити. Регуляція здійснюється за принципом зворотного зв'язку. Що Ви будете робити для підвищення виходу БАР?
23. У багатьох процесах біосинтез продукту може гальмуватись за рахунок катаболітної репресії. Який вихід Ви запропонували б?
24. Репресія і ретроінгібування. Що спільного між ними і чим вони відрізняються? Які співвідношення між цими механізмами?
25. Вам необхідно підвищити біосинтез триптофану. Які методи Ви запропонуєте?
26. Отриманий мутантний штам продукує триптофан безперервно. Чим це можна пояснити?
27. Регуляція біосинтезу триптофану здійснюється за принципом зворотнього зв'язку. При внесенні триптофану додатково в середовище в низьких концентраціях весь триптофан, що вноситься, засвоюється. При підвищенні концентрації триптофану, що вноситься, спостерігається його надлишок в середовищі. Чим це пояснити?
28. Як можна отримати конститутивні мутанти і яке їх значення в селекції продуцентів БАР?
29. Які існують способи регуляції активності ферментів?
30. Аллостеричні ефектори. Які сполуки можна до них віднести, які їхні властивості і роль у регуляції біосинтезу різних сполук?
31. Активна та неактивна форма ферментів. Чим вони відрізняються?
32. Вам необхідно перевести фермент з активної форми в неактивну (або навпаки). Як це можна зробити?
33. Що таке катаболітна репресія і яку роль відіграє в ній цАМФ?
34. Яка функція цАМФ в клітині?
35. Яким чином необхідно враховувати явище катаболітної репресії при отриманні продуцентів БАР?

36. В процесі біосинтезу глютаміну встановлено, що глютамінсинтетаза інгібується повністю тільки при наявності в середовищі 8 кінцевих продуктів метаболізму. При наявності одного чи декількох продуктів спостерігається часткове інгібування. Чим це пояснити?
37. Чим зумовлене явище кумулятивного ретроінгібування?
38. Яким чином при отриманні промислових продуцентів можна врахувати знання особливостей регуляції азотного метаболізму?
39. Що є сигналом в азотному метаболізмі для забезпечення клітини азотом?
40. Вам необхідно регулювати засвоєння азотовмісних речовин. Як це можна здійснити?
41. Яка роль протеїназ в регуляції клітинного метаболізму?
42. Яким чином Ваші знання про механізм протеолізу можна використати при конструюванні промислово важливих мікроорганізмів.
43. Вам необхідно підвищити деградацію клітинних білків. Яким чином Ви можете це здійснювати?
44. Яким чином вміст різних аденіннуклеотидів може впливати на метаболізм клітини?

До лабораторної роботи 5

1. Які процеси ведуть до обміну генетичної інформації у про- і еукаріот?
2. Яким способом можна здійснити рекомбінацію генетичного матеріалу?
3. Які задачі і обмежуючі фактори гібридизації як методу створення промислових продуцентів?
4. Гетерокаріони: яка їх роль в процесах обміну генетичної інформації?
5. Як, використовуючи кон'югацію, можна конструювати промислові штами мікроорганізмів?
6. Ви хотіли б використовувати для гібридизації кон'югацію. Які чинники можуть заважати або повинні бути обов'язково враховані?
7. Як можна використати кон'югацію в науці і практиці?

8. Яким чином впливають властивості фага (здатність до специфічної або неспецифічної трансдукції) на перспективу його подальшого використання для гібридизації?
9. Чи можливо трансдукувати плазмиду? Які труднощі Вас очікують на цьому шляху?
10. Яке застосування знайшла трансдукція в науці і практиці?
11. Що таке хромосомна трансформація та які її можливості при створенні промислово важливих штамів мікроорганізмів?
12. Що таке плазмідна трансформація та яка її роль в створенні промислово важливих штамів мікроорганізмів?
13. Яким чином можна використовувати трансформацію для конструювання штамів мікроорганізмів?
14. Яким чином можна використати трансформацію в науці і практиці?
15. Вам необхідно одержати протопласти. Як Ви будете це здійснювати?
16. Вам необхідно домогтися регенерації клітинної стінки у протопластів. Що для цього необхідно зробити?
17. В результаті злиття протопластів у Вас отримані фузанти. Як Ви будете здійснювати їх добір?
18. Єдиний спосіб одержати новий продуцент БАР – злиття протопластів. Приведіть свої аргументи «за» і «проти» його використання.
19. Єдиний спосіб одержати новий продуцент БАР – злиття протопластів. Яка буде послідовність Ваших дій?
20. Які переваги методу злиття протопластів при отриманні промислових штамів-продуцентів?